

***Malassezia pachydermatis* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil***

Malassezia pachydermatis in tegumentary and external acoustic meatus from healthy, with otitis and dermatopathies felines from Pelotas city, RS State, Brazil

Cristiano Silva da Rosa¹, Anelise Afonso Martins¹, Rosema Santin², Renata Osório de Faria³, Márcia de Oliveira Nobre⁴, Mário Carlos Araújo Meireles², Isabel Martins Madrid² & Patrícia da Silva Nascente⁵

RESUMO

Malassezia pachydermatis é uma levedura integrante da microbiota cutânea de diversas espécies animais, podendo ser o agente causador de otite externa e dermatite. Recentes trabalhos descreveram o isolamento de espécies lipodependentes em cães e gatos, porém estudos sobre a importância das demais espécies do gênero em pequenos animais, especialmente nos felinos, são escassos. Com o objetivo de analisar a frequência do gênero no tegumento cutâneo (TC) e meato acústico externo (MAE) de felinos, foram colhidas 228 amostras de material, sendo 152 provenientes do meato acústico externo (hígido ou otopata) e 76 de tegumento cutâneo (hígido ou dermatopata). Todas as amostras colhidas do MAE foram submetidas a exame direto e assim como as amostras de TC foram semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar Dixon modificado e ágar Sabouraud dextrose com cicloheximida e cloranfenicol. *Malassezia pachydermatis* foi a única espécie fúngica encontrada no meato acústico externo, sendo mais comum em felinos machos que em fêmeas (machos 56,25%, fêmeas 28,41%; $p < 0,05$). A proporção de isolamento foi semelhante entre felinos hígidos ou com lesões (dermatopatas ou otopatas). Baseado nos resultados deste estudo as espécies lipodependentes do gênero não foram isoladas e *M. pachydermatis* apresentou baixa frequência de isolamento em MAE e TC de felinos hígidos ou com lesões.

Descritores: *Malassezia pachydermatis*, felinos, otite, dermatite.

ABSTRACT

Malassezia pachydermatis yeast form an integral part of cutaneous microbiota from various animal species, and it is considered an etiological agent in otitis and dermatitis. Recent reports identify lipid-dependent species isolated in cats and dogs, however studies about the real importance of the others species of the genus, and are few in our country. With the objective to analyze frequency of the genus in skin and external acoustic meatus (EAM) in felines, 228 samples was studied, being 152 from external acoustic meatus (healthy or with otitis) and 76 from skin (healthy or with dermatopathies). All samples from EAM was analyzed by direct exam and cultured in Petri's plates containing modified Dixon agar and Sabouraud dextrose with cycloheximide and chloramphenicol. *Malassezia pachydermatis* was the only one species found. We observed that the isolation frequency in males was higher than in females, when analyzed EAM (males 56,25%, females 28,41%; $p < 0,05$). There are no difference between isolates from healthy felines and felines with lesions (dermatitis or otitis). From this study we can suggest that *Malassezia pachydermatis* is a component of MAE and TC from felines.

Key words: *Malassezia*, felines, otitis, dermatitis.

INTRODUÇÃO

As afecções do sistema tegumentar apresentam grande importância dentro da clínica médica de pequenos animais [25,33]. As leveduras do gênero *Malassezia*, são consideradas como habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo e pele, sendo isoladas também do reto, sacos anais e vagina de cães e gatos, além de ser considerado agente causador de otopatias e dermatopatias, porém raros relatos se referem as demais espécies lipodependentes habitando o tegumento destes animais [1-3,5,7,9,11,13,23,25-28].

Estudos preliminares determinaram que o gênero *Malassezia* possui sete espécies: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*, sendo a *M. pachydermatis* a única espécie não-lipodependente [16,17]. Nos últimos anos, foram identificadas mais quatro espécies lipodependentes do gênero: *M. japonica*, *M. dermatis*, *M. yamatonensis* e *M. nana*, isoladas de pacientes humanos [30-32].

Atualmente *M. pachydermatis* vem adquirindo maior importância nos quadros clínicos em felinos, sendo isolada dos sacos anais (16,7%), meato acústico externo (8%-18%), região anal (3,1%) e pele (2,5%) [10,20]. Também tem sido descrito o isolamento das espécies *M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis* em meato acústico e pele desta espécie [3,4,10]. Os estudos ainda não determinaram a importância patogênica desta levedura nos gatos, visto que proporções similares são encontradas tanto em animais hígidos, como com lesões [11,15].

O presente estudo teve como objetivo identificar as espécies do gênero *Malassezia* habitantes do meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos domésticos (*Felis catus*) do município de Pelotas (RS).

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de julho de 2004 à janeiro de 2005, foram colhidas 228 amostras de material proveniente de meato acústico externo (esquerdo e direito) e tegumento cutâneo de 76 felinos adultos, hígidos, otopatas e/ou dermatopatas, do município de Pelotas, RS, Brasil.

Após o registro dos dados principais (idade, raça, sexo), cada animal foi submetido a exame clínico, a fim de observar a higidez do meato acústico externo (MAE) e tegumento cutâneo (TC). As amostras colhidas do MAE foram obtidas com o auxílio de zaragatoas estéreis, enquanto que as provenientes do

TC foram colhidas utilizando-se a técnica do “quadrado do carpete” [24].

Todas as amostras do MAE foram submetidas a exame direto através da impressão por rolamento das zaragatoas em lâmina de microscopia e posterior coloração simples, para estudo da presença de leveduras compatíveis com o gênero *Malassezia*. O exame direto foi avaliado percorrendo-se toda a lâmina e contando as células leveduriformes considerando-se: (-) a ausência de células por campo visualizado; (+) para a presença de até cinco células por campo; (++) para a presença de seis a dez células por campo; e (+++) quando visualizado mais de dez células por campo [27].

As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar Dixon modificado (3,8% de extrato de malte; 0,6% de peptona; 2% de bile bovina dissecada; 1% de Tween 40; 0,2% de ácido oleico; 1,2% de ágar; pH 6,0) e ágar Sabouraud dextrose com cicloheximida e cloranfenicol e incubadas em uma temperatura de 32°C por até sete dias. Os aspectos macromorfológicos das leveduras foram estudados a partir das colônias isoladas nos dois meios de cultivo, enquanto que a micromorfologia foi analisada através de esfregaço dos cultivos corados por coloração simples.

Foram avaliadas as características bioquímicas através do teste de produção de catalase e urease. Para avaliação do teste bioquímico de catalase, foi colocada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% em uma lâmina de microscopia e logo após uma alçada da colônia estudada, considerando-se positivo quando ocorreu a produção de gás. Para o teste da uréia semeou-se o inóculo em meio de Christensen, incubando-se a 37°C por até 48h e observando-se alteração na cor do meio.

Os resultados foram analisados através do teste de “qui-quadrado” para comparação das frequências de isolamento de *M. pachydermatis*.

RESULTADOS

Das 228 amostras colhidas, 96 (42,11%) foram provenientes de felinos machos e 132 (57,89%) de fêmeas. Quanto à raça, 195 amostras (85,53%) provinham de felinos sem raça definida (SRD) e 33 (14,47%) de animais CRD (com raça definida), destes 21 (63,64%) eram da raça siamês, seis (18,18%) da raça persa e seis (18,18%) da raça himalaio.

O isolamento da levedura do gênero *Malassezia* foi obtido em 66 (28,94%) do total de 228 amos-

tras colhidas, destas, 60 foram obtidas do MAE (48 MAE hígido e 12 otopatas) e seis do TC (3 TC hígido e 3 otopatas) (Tabela 1).

A análise feita quanto ao sexo dos animais estudados, resultou em diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), estando os machos 36/96 (56,25%) com maior frequência em relação às fêmeas 24/132 (27,27%), quando analisado o isolamento de *M. pachydermatis* do MAE. Ao analisar os isolados do TC, não houve diferença estatística entre machos ($n=4$) e fêmeas ($n=2$), ainda que observada diferença numérica entre os sexos.

Quanto ao exame direto, em 74 amostras (32,46%) houve a ausência de leveduras por campo microscópico (-); em 91 (39,91%) observou-se de uma a cinco células por campo (+); 11 (4,82%) apresentaram de seis a dez células por campo (++) e em 52 (22,81%) observou-se presença de mais de dez células por campo (+++). Na microscopia óptica, foi possível observar células leveduriformes de forma oval com base larga a arredondada e também células com brotamento unipolar, compatíveis com *M. pachydermatis*.

Todas as 66 amostras isoladas caracterizaram-se por serem lipofílicas não dependentes, já que cresceram em meio ágar Dixon modificado e em meio ágar Sabouraud dextrose, catalase e urease positivas. Com estes resultados os isolados obtidos foram classificados como *M. pachydermatis*.

DISCUSSÃO

A levedura *M. pachydermatis* foi a única espécie isolada no presente trabalho, sendo encontrada em 66 (28,94%) das 228 amostras colhidas. Estudos anteriores isolaram *M. pachydermatis* do MAE de gatos

saudáveis na frequência de 8%, 14% e 18%, taxas menores que a encontrada neste estudo. Contudo, já foi descrito o isolamento de leveduras do gênero *Malassezia* do MAE de gatos na proporção de 33%, sendo este valor o mais próximo dos resultados alcançados neste trabalho [10,19,26,31].

No presente estudo, foi possível isolar a levedura em 7,89% do total de amostras colhidas do TC, enquanto que outros relatos demonstraram seu isolamento nas porcentagens de 2% e 2,5%, neste mesmo sítio anatômico [18,31]. Porém, em estudo anterior realizado nesta mesma região do Rio Grande do Sul, obteve-se um índice superior de isolamentos, com 22,8% de *M. pachydermatis* pesquisando o tegumento cutâneo de 57 felinos hígidos [26].

Das 28 amostras colhidas de animais com otite, a levedura foi isolada em 12 (42,86%), índice superior àquele encontrado em felinos otopatas que fica em torno de 18% [15]. A importância de leveduras do gênero *Malassezia* em felinos ainda é incerta, visto que frequências de isolamento semelhantes podem ser observadas, tanto em animais hígidos como naqueles com otites.

Ainda que a maioria dos estudos demonstre não haver predisposição sexual para o isolamento da levedura, este estudo revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) para os machos (56,25%) em relação às fêmeas (27,27%) quanto ao isolamento da *M. pachydermatis* proveniente de MAE com otite [18, 23,27]. Quando feita a mesma análise em relação ao isolamento da *M. pachydermatis* no TC, não houve diferença estatística significante, embora tenha sido observada a mesma tendência encontrada no MAE, onde a levedura foi isolada em 12,50% dos machos e 4,55% das fêmeas, porém sem apresentar diferença estatística significativa.

Em relação ao teste de catalase, todas as amostras analisadas tiveram reação positiva, o mesmo tem sido observado em estudos com *M. pachydermatis* em cães, sendo descrito que a única espécie que apresenta reação de catalase negativa com crescimento em meio de cultura enriquecido com ácidos graxos é a *M. restricta* [1,2,8,14,17,19,27]. Da mesma forma, o teste de hidrólise da uréia, observado até 48 horas após crescimento da levedura,

Tabela 1. Distribuição do número de isolados de *Malassezia pachydermatis* obtidos de material proveniente de meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos da cidade de Pelotas-RS no período de julho de 2004 à janeiro de 2005.

Amostras	Isolamentos n	Sem isolamento n	Total n(%)
Meato acústico externo hígido	48	76	124(54,39)
Meato acústico externo de cães otopatas	12	16	28(12,28)
Tegumento cutâneo hígido	3	44	47(20,61)
Tegumento cutâneo hígido de dermatopatas	3	26	29(2,72)
Total	66(28,94%)	162(71,06%)	228(100)

apresentou índice de 100% de positividade nas amostras dos felinos estudados, resultado idêntico àquele obtido em amostras de cães em 24-48 horas [1,2,7,9,27]. Por outro lado, já havia sido descrita reação positiva para uréia em 87% de isolados em 48 horas utilizando amostras de cães, enquanto que em outros isolados de cães e gatos foi observada urease positiva em 74% das amostras, sendo que a positividade não teve relação com a espécie animal estudada [13,26].

CONCLUSÃO

M. pachydermatis pode ser isolada de amostras colhidas do tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidios, dermatopatas ou otopatas.

Entretanto, nenhuma espécie lipodependente do gênero *Malassezia* foi isolado neste trabalho. A levedura pode ser isolada com maior frequência no MAE do que no TC, assim como em maior frequência em felinos machos do que em fêmeas, quando analisado MAE com otite. O isolamento da levedura em TC de felinos hígidios ou dermatopatas, revelou-se menor quando comparada ao isolamento a partir de meato acústico externo. *M. pachydermatis* não foi observada frequentemente associada a otopatias ou dermatopatias nos felinos estudados.

Agradecimentos. À CAPES, CNPq, FAPERGS. Ao Hospital de Clínicas Veterinária (UFPEL) e à Prof. Marta Bauer Fehlberg, pela permissão na colheita das amostras.

REFERÊNCIAS

- 1 **Baptista G., Fishman O., Martins E.C.S., Forjaz N.H.H. & Zaror L. 1986.** Características fisiológicas de levaduras del genero *Malassezia*. *Revista Argentina de Micología*. 9: 5-6.
- 2 **Bond R. & Anthony R.M. 1995.** Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *Journal of Applied Bacteriology*. 78: 537-542.
- 3 **Bond R., Anthony R.M., Dodd M. & Lloyd D.H. 1996.** Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. *Journal of Medical Veterinary Mycology*. 34: 145-147.
- 4 **Bond R., Howell S.A., Haywood P.J. & Lloyd D.H. 1997.** Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Veterinary Record*. 141: 200-201.
- 5 **Bond R., Lamport A.I. & Lloyd D.H. 2000.** Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Research in Veterinary Science*. 68: 291-293.
- 6 **Bornand V. 1992.** Bacteriologie and mycology of otites externa in dogs. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 134: 1-8.
- 7 **Carlotti D.N. 1997.** Canine and feline superficial fungal skin infectious. *Veterinary Quarterly*. 19: 45-46.
- 8 **Coutinho S.D. 1997.** *Malassezia pachydermatis*: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e meato acústico externo de cães. 108f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- 9 **Coutinho S.D. 2003.** Malasseziose: A necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em Medicina Veterinária. *MEDVEP*. 1: 70-73.
- 10 **Crespo M.J., Abarca M.L. & Cabañes F.J. 1999.** Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1573-1574.
- 11 **Crespo M.J., Abarca M.L. & Cabañes F.J. 2000.** Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 1263-1266.
- 12 **Crespo M.J., Abarca M.L. & Cabañes F.J. 2000.** Evaluation of Different Preservation and Storage methods for *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3872-3875.
- 13 **Dworecka-Kaszak B., Synkiewicz Z. & Blaszczyk B. 1994.** Evaluation of selected physiological and morphological characteristics of *Pityrosporum pachydermatis* isolated from clinical cases of otitis externa and dermatitis in dogs and cats. *Archivum Veterinarium Polonicum*. 34: 163-175.
- 14 **Dworecka-kaszak B. & Toka F.N. 1999.** What's new about *Malassezia pachydermatis*? *Mikologia Lekarska*. 6: 133-143.
- 15 **Greene C.E. 1998.** Integumentary infectious. Otitis externa. In: Greene C.E. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia, WB Saunders. pp. 549-554.
- 16 **Guého E. & Guillot J. 1999.** Letter to the editor: Comments on *Malassezia* species from dogs and cats. *Mycoses*. 42: 673-674.
- 17 **Guého E., Midgley G. & Guillot J. 1996.** The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 69: 337-355.
- 18 **Guillot J. & Bond R. 1999.** *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Mycology*. 37: 295-306.

- 19 Guillot J., Guého E., Lesourd M., Midgley G., Chévrier G. & Dupont B. 1996. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. *Journal Mycologie Médicale*. 6: 103-110.
- 20 Hajsig D., Hajsig M. & Svoboda-Vukovic D. 1990. Nalazi kvasca *Malassezia pachydermatis* u zdravih macaka (*Malassezia pachydermatis* in health cats). *Veterinarski Arhiv*. 60: 69-73.
- 21 Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H. & Hasegawa A. 2004. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 623-627.
- 22 Larsson C.E., Larsson M.H.M.A., Amaral R.C., Gandra C.R.P., Hagiwara M.K. & Fernandes W.R. 1988. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. *Archives of Veterinary* 4: 63-68.
- 23 Machado M.L.S., Appelt C.E., Ferreiro L. & Guillot J. 2003. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. *Clínica Veterinária*. 44: 27-34.
- 24 Mariat F. & Adan-Campos C. 1967. La technique du carré de tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. *Annales de l'Institut Pasteur*. 113: 666-669.
- 25 Mazzei C.R.N., Larsson C.E., Gambale W., Rodrigues C.P. & Valente N.S. 2002. Malasseziose tegumentar canina: estudo clínico-epidemiológico retrospectivo de 92 casos (1989 a 1995), São Paulo, Brasil. *Revista Educação Continuada CRMV-SP*. 5: 243-252.
- 26 Nascente P.S., Nobre M.O., Meinerz A.R.M., Gomes F.R., Souza L.L. & Meireles M.C.A. 2004. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. *Revista Brasileira Medicina Veterinária*. 26: 79-82.
- 27 Nobre M.O. 1998. Prevalência da *Malassezia pachydermatis* e outras agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. 79 f. Pelotas, RS. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- 28 Plant J. D., Rosenkrantz W.S. & Griffin E.C. 1992. Factores associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 201: 879-882.
- 29 Raabe P., Mayser P. & Weiss R. 1998. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses*. 41: 493-500.
- 30 Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R. & Nishikawa A. 2003. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4695-4699.
- 31 Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H. & Nishikawa A. 2002. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 1363-1367.
- 32 Sugita T., Tajima M., Takashima M., Amaya M., Saito M., Tsuboi R. & Nishikawa A. 2004. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiology Immunology*. 48: 579-583.
- 34 Wilkinson G. T. & Harvey R.G. 1996. *Dermatologia dos pequenos animais - Guia para o diagnóstico* - 2.ed. São Paulo: Manole, 304p.
- 35 Woody B. J. & Fox S. M. 1987. Otite externa: revisando os sintomas para descobrir a causa determinante. *Cães & Gatos*. 17: 38-41.